

两种壳色福寿螺免疫功能的比较研究

赵柳兰¹, 蒲 粟¹, 杨 淞^{1*}, 杨 黎¹, 刘 巧¹,
赵金全¹, 严大明¹, 章家恩²

(1. 四川农业大学动物科技学院, 四川 雅安 625014;

2. 华南农业大学热带亚热带生态研究所, 广东 广州 510642)

摘要: 为了解黑壳和黄壳福寿螺免疫功能的差异, 本实验研究了氯硝柳胺对两种壳色福寿螺的急性毒性效应, 并对四川地区黑壳福寿螺和黄壳福寿螺血细胞酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、过氧化物酶(POX)、中性红(NRD)、脂类(PAS)和糖原(SBB)细胞化学染色的观察及中性红试验(NRRT)的差异进行了比较。结果显示, 黑壳福寿螺对氯硝柳胺 24 h 和 48 h 的半致死浓度分别为 0.77 mg/L 和 0.46 mg/L, 均高于黄壳福寿螺。透明细胞和颗粒细胞的细胞化学染色阳性主要分布在细胞质, 且颗粒细胞中的颗粒物呈强烈阳性; 黑壳福寿螺 ACP、AKP、POX 阳性比例均大于黄壳福寿螺, 且前者 AKP 和 POX 阳性细胞比例显著大于后者, NRD 和 SBB 着染程度和阳性比例均无显著差异, 黑壳福寿螺 PAS 着染程度更为强烈。NRRT 实验发现, 黑壳福寿螺血细胞的中性红滞留时间(9.15 min)是黄壳福寿螺的 1.8 倍。研究表明, 黑壳福寿螺对氯硝柳胺死亡率及血细胞 AKP、POX、糖原成分及中性红滞留时间是影响其与黄壳福寿螺免疫功能差异的重要因素。

关键词: 福寿螺; 血细胞; 免疫功能; 壳色; 细胞化学; 中性红试验

中图分类号: S 941.54

文献标志码: A

福寿螺(*Pomacea canaliculata*)属软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、中腹足目(Mesogastropoda)、瓶螺科(Pilidae)、福寿螺属(Pomacea), 是我国 16 种“危害最大的外来物种”之一^[1]。同时, 它也是广州管圆线虫和卷棘口吸虫的主要寄主, 误食后容易导致人嗜酸性脑膜炎, 故引起人们极大的关注^[2]。由于其适应性广, 繁殖力强, 因此入侵及扩散一直未得到有效的控制^[3]。

目前分布在我国大陆的福寿螺主要有黑壳福寿螺和黄壳福寿螺, 其在不同地区自然分布存在很大差异, 广西以黑壳福寿螺为主, 云南、广州以黄壳福寿螺为主^[4]。有研究表明, 斑马蛤壳色群体具有更高的成活率和更强的抗逆性^[5], 其血细胞中酚氧化酶(phenoloxidase,

PO)、亮氨酸基肽酶(leucine aminoptidase, LAP)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性高, 吞噬能力强^[7], 说明贝类的壳色与免疫功能之间存在密切关系^[5-6]。此外, 不同壳色福寿螺对广州管圆线虫的易感性不同, 但相关原因尚不清楚^[7]。

福寿螺属于软体动物, 其免疫相比许多节肢动物和高等动物更依赖于非特异性免疫, 细胞内的水解酶活力、吞噬能力和细胞介导对病原的细胞毒作用是免疫功能的主要表现^[5-6]。血细胞是细胞免疫的基础, 酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)、过氧化物酶(oxidase, POX)是研究血细胞免疫功能的重要酶类^[8-10]。糖原和脂类则为免疫功能的发挥提供必要能

收稿日期: 2014-02-13

修回日期: 2014-04-15

资助项目: 国家自然科学基金(U1131006); 四川农业大学“双支计划”(03570202)

通信作者: 杨 淞, E-mail: ysys210@hotmail.com

量,中性红滞留时间长短标志溶酶体膜的变化,是预测贝类总体健康状况的一种理想参考指标^[11-12]。福寿螺免疫功能的研究是揭示其抗逆性的关键,可为其防治提供参考^[13],而其免疫功能方面仅见血细胞分类的报道^[13-14]。氯硝柳胺是一种常用杀螺剂,能影响不同规格福寿螺的存活^[15]。本实验旨在研究氯硝柳胺对两种壳色福寿螺的急性毒性效应,并对野外分布的两种壳色福寿螺血细胞中细胞化学成分和中性红试验(NRRT)进行比较,以期对两种壳色福寿螺分布差异提供免疫学基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

福寿螺采自四川雅安市大兴镇池塘,室温水族箱(22~25℃)暂养一周,每天用曝气24h后的自来水换水1/2,暂养期间连续增氧,投喂水花生,实验前3d停止喂食,挑选健康的福寿螺[壳高(SH):30 mm ≤ SH < 40 mm]供实验使用,不同壳色的判断参考孙志坚等^[16]的方法,具体如下:黑壳福寿螺壳呈黑色,贝壳上有横条纹,肌肉为灰白色,外套膜为黑色;黄壳福寿螺壳呈金黄色,贝壳上没有横的条纹,肌肉呈黄色,外套膜也为黄色。

1.2 氯硝柳胺对黑壳福寿螺和黄壳福寿螺急性毒性实验

将氯硝柳胺(50%氯硝柳胺乙醇胺盐,四川省化学工业研究设计院生产)用曝气好的自来水配制成浓度为0(对照组)、0.5、0.7、0.9、1.1 mg/L的药液。挑选30 mm ≤ SH < 40 mm健康的黑壳福寿螺和黄壳福寿螺各150只,每个浓度组设3个平行,每个平行10只螺,置于直径15 cm深8 cm塑料盆中,用塑料网防逃。实验时每个容器药液体积为2 L,每12 h分别更换同浓度药液记录2、4、6、10、24、48 h的死亡率,死亡判断标准参照赵本良等^[17]的方法,具体如下:从处于抑制状态的福寿螺中挑选腹足已脱出或用镊子轻拉后不收回的,将其放入脱氯清水中,漂浮于水面或悬浮于水中对刺激已无反应者为死螺。死亡率=每次检查时累计死亡个数/实验福寿螺总数×100%。

1.3 血细胞化学染色及中性红试验

血淋巴的抽取及血涂片的制作 用1 mL无菌注射器心脏取血,注射器用抗凝剂(柠檬酸

三钠30 mmol/L,氯化钠338 mmol/L,葡萄糖115 mmol/L,EDTA 10 mmol/L,pH 7.0)润洗,之后立即取血淋巴滴于干净的载玻片上,用新鲜配制的固定剂(2.5%戊二醛)在4℃固定15 min,置于无菌箱干燥,待用。

细胞化学染色^[9,18-20] 萘酚AS-TR磷酸酯染酸性磷酸酶(ACP),偶氮偶联法染碱性磷酸酶(AKP),DAB-H₂O₂(diamino benzidine,DAB)染过氧化物酶(POX),前3种酶的阴性对照均采用生理盐水代替孵育液孵育;过碘酸-Schiff(PAS)反应显示糖原,阴性对照采用唾液淀粉酶消化处理;苏丹黑B(SBB)染色显示脂类物质,阴性对照用丙酮处理;用中性红试剂染溶酶体酶,阴性对照同前3种酶。两种壳色福寿螺均为10只,每种染色分析18张片,每片大约计数200个细胞,若全部细胞均着色不计算阳性比例,若有部分细胞着色则计算其阳性比例,阳性比例=阳性细胞个数/计数的血细胞个数×100%。

中性红试验^[11,21] 将血涂片于中性红染液中着色,从中性红细胞着色开始计时,之后每2 min观察一次,计数不同时间的中性红的着色比例(着色比例=着染的血细胞数目/计数的血细胞数目×100%),实验进行15 min,计算血细胞着色比例达到50%的时间。

1.4 统计方法

采用SPSS 13.0软件对实验数据进行统计分析,采用T-test检验分析,取P < 0.05为差异显著,在EXCEL上绘制相关图表。

实验数据的统计处理依据GB/T 13267-1991,使用概率单位图解法计算半数致死浓度(LC₅₀)^[17]。

2 结果

2.1 两种壳色福寿螺对氯硝柳胺死亡率的影响

通过概率单位法得出黑壳福寿螺24 h和48 h半致死浓度LC₅₀均大于黄壳福寿螺(表1)。两种壳色福寿螺的死亡率均随着氯硝柳胺浓度和处理时间的延长呈上升趋势(除最高浓度1.1 mg/L组外)(图1)。在相同时间不同壳色福寿螺的死亡率存在差异,高浓度组(1.1 mg/L)在6~10 h黑壳福寿螺的死亡率显著高于黄壳福寿螺(P < 0.05),在24 h之后黄壳福寿螺的死亡率高于黑壳福寿螺,且高浓度(1.1 mg/L)组

两种壳色福寿螺的死亡率存在显著差异 ($P < 0.05$)。48 h 之后,0.9 和 1.1 mg/L 浓度组福寿螺全部死亡。

表 1 氯硝柳胺对两种壳色福寿螺的 LC_{50} 值
Tab.1 LC_{50} value of niclosamide from two shell colours of *P. canaliculata*

	时间/h time	线性方程 linear equation	相关系数 correlation coefficient	$LC_{50}/$ (mg/L)	LC_{50} (95% 的置信区间)/(mg/L) confidence interval
黑壳福寿螺 the black-shell snails	24	$y = 1.905\ 9x + 5.218\ 6$	$R^2 = 0.976\ 1$	0.77	0.59 ~ 0.99
	48	$y = 10.454x + 8.495\ 7$	$R^2 = 1$	0.46	0.43 ~ 0.499
黄壳福寿螺 the yellow-shell snails	24	$y = 2.749\ 3x + 5.437\ 2$	$R^2 = 0.937\ 5$	0.69	0.57 ~ 0.83
	48	$y = 9.892\ 9x + 8.408\ 8$	$R^2 = 1$	0.45	0.42 ~ 0.49

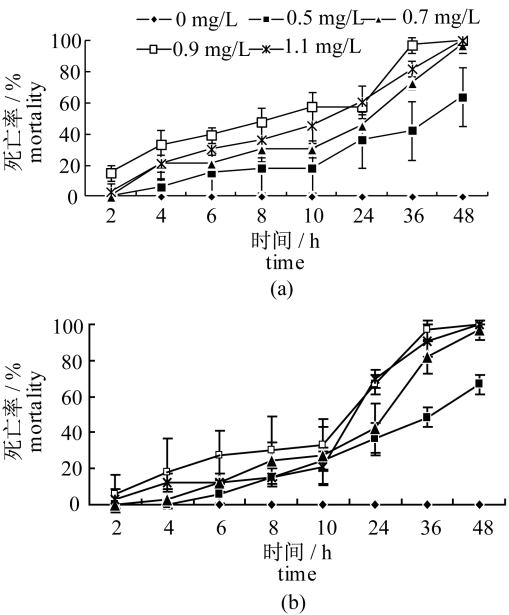


图 1 氯硝柳胺对两种壳色福寿螺死亡率的影响
(a)黑壳福寿螺,(b)黄壳福寿螺
Fig.1 Effect of niclosamide on the mortality from two shell colours of *P. canaliculata*
(a) the black-shell snails,(b) the yellow-shell snails

2.2 两种壳色福寿螺血细胞细胞化学观察

两种壳色福寿螺血细胞 AKP、ACP、POX、PAS、SBB 和 NRD 阳性均主要分布在细胞质,而 AKP、POX 及 PAS 偶见细胞核着染,透明细胞和颗粒细胞的着色程度不一致(表 2)。

碱性磷酸酶 两种壳色福寿螺血细胞 AKP 阳性呈红色(图版-1~6),透明细胞细胞质呈淡红色(图版-1,◀示),颗粒细胞的细胞质中颗粒物质呈深红色(图版-2~6,◀示);着色的颗粒物质分布存在差异,大部分较均匀(图版-1、3,◀示),出现仅中部颗粒物质着染(图版-2,◀示),存在整个细胞质充满了强烈阳性的颗粒

(图版-4,◀示)及整个呈深红色类核影细胞(图版-2 和 3,◀示);两种壳色福寿螺血细胞其 AKP 阳性比例存在极显著差异 ($P < 0.01$) (图 2),黑壳福寿螺所有血细胞均呈阳性(图版-1~4),出现少数着色较淡的血细胞(图版-4,◀示),而黄壳福寿螺仅部分血细胞呈阳性(图版-6,◀示阴性细胞,◀示阳性细胞)。

酸性磷酸酶 两种壳色福寿螺血细胞的 ACP 阳性呈红色(图版-8、9);透明细胞的细胞质淡红色(图版-8、9,◀示),颗粒细胞的细胞质颗粒物质红褐色,呈强阳性(图版-8、9,◀示);两种壳色福寿螺血细胞其 ACP 阳性比例不存在显著差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

表 2 黑壳福寿螺和黄壳福寿螺不同血细胞细胞化学染色的比较

Tab.2 Cytochemistry characterization of different hemocytes in the black-shell snails and the yellow-shell snails

	黑壳福寿螺 the black-shell snail		黄壳福寿螺 the yellow-shell snail	
	透明细胞 hyalinocytes	颗粒细胞 granulocytes	透明细胞 hyalinocytes	颗粒细胞 granulocytes
AKP	++	++(+)	(+)	++(+)
ACP	(+)	(++)	(+)	(++)
POX	(++)	(+++)	(+)	(++)
PAS	++	+++	+	++
SBB	+	++	+	++
NRD	+	++	+	++

注: + 染色阳性; ++ 染色阳性较深; +++ 染色阳性强烈; (+) 细胞部分阳性,部分阴性; (++) 细胞部分染色阳性较深,部分阴性; (+++) 部分细胞强烈阳性,部分阴性; ++ (+) 细胞均阳性,但是部分细胞强烈阳性,部分阳性较深; - 染色阴性
Notes: + positive staining; ++ positive staining slightly; +++ positive staining intensively; (+) part of positive staining; (++) part of positive staining slightly; (+++) part of positive staining intensively; ++ (+) part of positive staining slightly and part of positive staining intensively; - negative staining

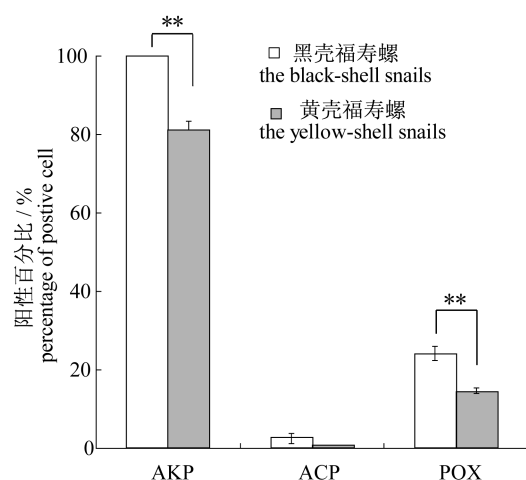


图2 黑壳福寿螺和黄壳福寿螺
免疫酶阳性细胞的比例差异

Fig.2 Percentage of positive hemocytes in the black-shell snails and the yellow ones

** $P < 0.01$

过氧化物酶 两种壳色福寿螺部分血细胞POX 阳性呈棕色(图版-10、11);透明细胞的细胞质淡棕色(图版-10、11,◀示),有的细胞中存在大棕色颗粒物质(图版-11,←示),颗粒细胞的细胞质颗粒物质深棕色,呈强烈阳性(图版-10、11,←示),阴性对照见图版-12(◀示血细胞);两种壳色福寿螺血细胞阳性细胞比例差异显著(图版-10←示阳性细胞,◀示阴性细胞),黑壳福寿螺阳性细胞显著高于黄壳福寿螺($P < 0.01$)(图2)。

过碘酸雪夫氏剂(periodic acid Schiff's, PAS) 两种壳色福寿螺所有血细胞PAS 均阳性(表2),红色,透明细胞的细胞质,呈阳性(图版-13、14,◀示),颗粒细胞的细胞质中的颗粒物质强烈阳性(图版-13、14,←示),有少数细胞细胞核也染上深红色(图版-15,←示),且这些细胞质中的颗粒物质分布不均匀(图版-15,◀示),阴性对照见图版-20;黑壳福寿螺的血细胞染色程度较黄壳福寿螺更为强烈(图版-13、14)。

苏丹黑(sudan black B, SBB) 两种壳色福寿螺所有血细胞SBB 均有阳性分布(表2),黑色,透明细胞淡黑色,颗粒细胞胞质中颗粒物质强烈阳性(图版-16、17,←示颗粒细胞,◀示透明细胞),阴性对照与PAS 相同(图版-20)。

中性红(neutral red dye, NRD) 两种壳色福寿螺血细胞中的NRD 阳性呈红色,透明细胞淡红色(图版-18、19,←示);颗粒细胞细胞质中颗粒

物质强烈阳性(图版-18、19,◀示),偶见整个细胞呈强烈阳性的大颗粒细胞(图版-18,◀示),类核影细胞淡红色(图版-18、19,◀示),阴性对照与PAS 相同(图版-20)。对两种壳色福寿螺中性红试验结果表明:黑壳福寿螺达到50%的血细胞着色时间是9.15 min,是黄壳福寿螺时间的1.8倍,为7.35 min(图3)。

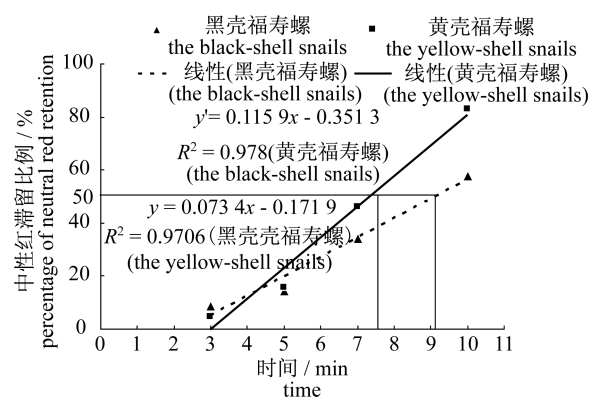


图3 黑壳和黄壳福寿螺血细胞中性红实验

Fig.3 The neutral red retention time of hemocytes in the black- and yellow-shell snails

3 讨论

3.1 两种壳色对氯硝柳胺敏感性比较

根据概率单位法得出黑壳福寿螺24 h 和48 h 的半致死浓度均高于黄壳福寿螺,说明黄壳福寿螺较黑壳福寿螺更为敏感,这可能与福寿螺自身免疫能力相关。一般情况下,随着药物浓度增加和实验时间延长两种壳色福寿螺死亡率上升。高浓度组(1.1 mg/L),6 ~ 10 h 黑壳福寿螺的死亡率显著高于黄壳福寿螺,这可能与黄壳福寿螺在高浓度组中一开始就厝壳紧闭有关,其应对外界药物应激的免疫方式与低浓度不同^[22]。24 h 后,黑壳福寿螺死亡率低于黄壳福寿螺,主要原因是黑壳福寿螺除出现厝壳紧闭外,还与沉入水底瞬间呼吸管分泌大量粘液进行自我保护有关^[23]。福寿螺颗粒细胞在免疫吞噬作用中起主要作用,黑壳福寿螺呼吸管上皮基底质部含有大量粗大的黑色颗粒物质,而黄壳福寿螺则未见^[16]。已有研究表明,黑壳福寿螺血细胞中颗粒细胞比例与黄壳福寿螺存在差异^[14]。但这些黑色颗粒物质与其免疫功能的关系需要进一步研究。

3.2 两种壳色血细胞细胞化学差异

细胞化学是目前血细胞研究常用方法之一,

通过观察血细胞中不同成分的化学特性可在细胞种类和功能间建立联系^[9]。贝类血细胞主要靠吞噬方式抵御外来物和病原体^[8-10]。酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)能够对血细胞吞噬细菌和其他颗粒物进行消化降解^[8]。过氧化物酶(POX)伴随吞噬,引起氧呼吸爆发,具有杀菌作用^[8-9]。因此,ACP、AKP 和 POX 在吞噬作用中起着重要作用。目前相关研究报道在双壳类研究中较多,如浅沟蛤(*Scrobicularia plana*)^[19]、贻贝(*Mytilus edulis*)、鸟蛤(*Cerastoderma edule*)^[20]等,而腹足类较少,仅见于静水椎实螺(*Lymnaea stagnalis*)^[18]。本实验两种壳色福寿螺全部或部分颗粒细胞 ACP、AKP 和 POX 阳性着染,且呈强烈阳性,表明两种壳色福寿螺颗粒细胞中的这 3 种酶活性较强,这与静水椎实螺的研究一致^[18]。也有 POX 弱阳性(如浅沟蛤^[19])或 POX 着染阴性(如贻贝^[20]),表明不同种属血细胞的细胞化学特征存在差异。本研究还发现,AKP 阳性细胞着色的颗粒物分布也存在差异,这与其胞质中颗粒物的分布有关^[19]。呈 AKP 阳性染色的细胞出现少数染色较淡,这可能与细胞种类(嗜酸性或嗜碱性颗粒细胞)或发育阶段有关^[24]。

免疫酶细胞阳性比例能够指示其免疫功能^[23-25]。统计发现,黑壳福寿螺 AKP 阳性比例最高(100%),黄壳福寿螺 AKP 较低(81.2%)。研究表明,AKP 阳性比例较低的贝类,其养殖过程中疾病常发^[26],说明 AKP 阳性比例较高预示较强的免疫力。福寿螺具有较强的适应性,可能与高阳性比例的 AKP 相关。同时,黑壳福寿螺 ACP、AKP 和 POX 的阳性细胞比例均大于黄壳福寿螺。这表明前者血细胞较后者可能具有更好的吞噬和清除自由基能力。

贝类肝胰脏中脂类物质能够发挥抑菌效果^[27-28],本实验中两种壳色福寿螺血细胞 SBB 呈阳性,说明血细胞中具有脂类物质,能够发挥抗菌活性以及供能,揭示其强的抗逆性。

糖原是真核生物最重要的短期存储物质,是 ATP 唯一能量来源,其合成和分解比脂类迅速,在抵御环境变化(如抗逆境)过程中尤为重要。糖原颗粒越多 PAS 染色越深。有的整个细胞着染时形成糖原湖(glycogen lake),如浅沟蛤^[19]和文蛤^[29]。含糖原湖的细胞具有更活跃的吞噬

功能^[17,30]。贝类利用分解糖原产能以利于调节渗透压^[19,29]。黑壳福寿螺 PAS 阳性较黄壳福寿螺更为强烈,揭示具有更强的免疫防御机能。

3.3 两种壳色中性红差异

溶酶体是位于细胞质内被膜包围呈球形的细胞器,它的主要功能是激活血细胞的吞噬作用,释放水解酶类降解外来物质,从而达到消化和清除异物的目的^[5-6,31]。中性红滞留时间的长短反映溶酶体稳定性,滞留时间越长稳定性越好^[11-12]。利用中性红滞留时间法(NRRT)可作为预测贝类总体健康状况的一种理想参考指标^[11-12,32-33]。两种壳色福寿螺血细胞中性红染色均呈阳性,这与 Accorsi 等^[13]研究结果一致。黑壳福寿螺血细胞的中性红滞留时间为 9.15 min,黄壳福寿螺是 7.35 min,前者是后者的 1.8 倍,说明前者溶酶体膜更为稳定。Russo 等^[34]发现溶酶体膜的稳定性与活性氧(ROS)的产生有直接关系,活性氧自由基可能产生于溶酶体小室,能够导致膜的稳定性降低,从而导致溶酶体酶的流失^[35]。在吞噬过程中,溶酶体作为关键性的细胞器,可通过细胞膜受体介导的内吞作用来降解有害物^[36-37]。黑壳福寿螺的溶酶体膜更为稳定,为更好地介导吞噬作用提供了基础。

参考文献:

- [1] Li X H, Hu Y C, Song H M, et al. Invasion and monitoring methods of *Pomacea canaliculata* for in China [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25 (14): 229 - 232. [李小慧, 胡隐昌, 宋红梅, 等. 中国福寿螺的入侵现状及防治方法研究进展. 中国农学通报, 2009, 25 (14): 229 - 232.]
- [2] Dong C L. Studies on bioecology of the golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) and its status of distribution and Damage in Guangxi [D]. Nanning: Guangxi Normal University, 2006. [董朝莉. 福寿螺的生物生态学特性及在广西的分布危害现状研究. 南宁: 广西师范大学, 2006.]
- [3] Wada T, Matsukura K. Seasonal changes in cold hardiness of the invasive freshwater apple snail, *Pomacea canaliculata* (Lamk) [J]. Malacologia, 2007, 49 (2): 383 - 392.
- [4] Xu J R, Shen H, Li X G, et al. Genetic rule analysis of shell color in two species of *Ampullaria gigas* [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2008 (4): 210 - 212. [徐建荣, 沈辉, 李旭光, 等. 不同品系福寿螺壳色

- 性状的遗传规律分析. 江苏农业科学, 2008 (4): 210 - 212.]
- [5] Yan X W, Zhang G F, Yang F, *et al.* A comparison of growth and development of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) from two pedigrees [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2005, 20 (4): 266 - 269. [闫喜武, 张国范, 杨凤, 等. 菲律宾蛤仔莆田群体两个壳色品系生长发育的比较. 大连水产学院学报, 2005, 20 (4): 266 - 269.]
- [6] Ding J F, Yang F, Yan X W, *et al.* Comparison of the immune defense functions in Manila clam *Ruditapes philippinarum* with different shell colors [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27 (5): 411 - 416. [丁鉴锋, 杨霏, 闫喜武, 等. 不同壳色菲律宾蛤仔免疫机能的比较研究. 大连海洋大学学报, 2012, 27 (5): 411 - 416.]
- [7] Zeng Q X, Sun Z J, Zhang B, *et al.* Susceptibility for different varieties of *Pomacea canaliculata* to *Angiostrongylus cantonensis* in South China [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2011, 27 (7): 625 - 628, 633. [曾清香, 孙志坚, 张波, 等. 中国南方不同品系福寿螺对广州管圆线虫易感性的研究. 中国人兽共患病学报, 2011, 27 (7): 625 - 633.]
- [8] Liu S L, Mai K S. The progress of studies on molluscs immunological system and mechanism-A review [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2003, 25 (2): 95 - 105. [刘世良, 麦康森. 贝类免疫系统和机理的研究进展. 海洋学报, 2003, 25 (2): 95 - 105.]
- [9] Wémeson F S, Mizue I E, Antenor A S, *et al.* Cytochemical, immunocytochemical and ultrastructural observations on leukocytes and thrombocytes of fat snook (*Centropomus parallelus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31 (4): 571 - 577.
- [10] Sun J F, Wu X Z. The progress of studies on molluscan hemocyte and its immunological function [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 12 (5): 601 - 607. [孙敬峰, 吴信忠. 贝类血细胞及其免疫功能研究进展. 水生生物学报, 2006, 30 (5): 601 - 607.]
- [11] Segien P O. Inhibitors of lysosomal function [J]. Methods in Enzymology, 1983, 96 (6): 737 - 765.
- [12] Dailianis Domouhtsidou S G P, Raftopoulou E, Kaloyianni M, *et al.* Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L), in pollution monitoring [J]. Marine Environmental Research, 2003, 56 (4): 443 - 470.
- [13] Accorsi A, Buccib L, Eguileor M, *et al.* Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34 (5): 1260 - 1268.
- [14] Yang S, Zhao L L, Zhang S, *et al.* A comparative study of haemocytes from different shell colours of golden apple snails (*Pomacea canaliculata*) [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2013, 32 (5): 722 - 728. [杨淞, 赵柳兰, 张爽, 等. 不同壳色福寿螺血细胞的比较研究. 四川动物, 2013, 32 (5): 722 - 728.]
- [15] Huang P. Studies on biological characteristics of *Pomacea canaliculata* Lamarck and toxicity test of pesticides [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2010. [黄鹏. 福寿螺生物学特性及药剂毒力测定. 福州: 福建农林大学, 2010.]
- [16] Sun Z J, Zeng Q X, Zhang B, *et al.* Comparison on main morphologic characters for different varieties of *Pomacea canaliculata* in China [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2011, 27 (3): 184 - 189. [孙志坚, 曾清香, 张波, 等. 中国不同品系福寿螺主要形态比较. 中国人兽共患病学报, 2011, 27 (3): 184 - 189.]
- [17] Zhao B L, Zhang J E, Cheng C G, *et al.* Study on the toxic effect of calcium oxide on *Pomacea canaliculata* [J]. Ecology and Environment, 2010, 19 (12): 2916 - 2921. [赵本良, 章家恩, 成朝刚, 等. 生石灰对福寿螺的毒性效应研究. 生态环境学报, 2010, 19 (12): 2916 - 2921.]
- [18] Mohandas A, Adema C M, Knaap W P W, *et al.* The effect of haemolymph extraction on distribution of lysosomal enzymes in *Lymnaea stagnalis* haemocytes: A cytochemical study [J]. Comparative Haematology International, 1992, 2 (2): 61 - 67.
- [19] Wootton E C, Pipe R K. Structural and functional characterization of the blood cells of the bivalve mollusc, *Scrobicularia plana* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2003, 15 (3): 249 - 262.
- [20] Wootton E C, Dyrynda E A, Ratcliffe N A. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2003, 15 (3): 195 - 210.
- [21] Svendsen C, Weeks J M. The use of a lysosome assay for the rapid assessment of cellular stress from copper to the freshwater snail *Viviparus contectus* (Millet) [J]. Marine Pollution Bulletin, 1995, 31 (1 - 3): 139 - 142.

- [22] Zhao L, Yang X, Cheng Y, *et al.* Effects of histamine on survival and immune parameters of the chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. Journal of Shellfish Research, 2012, 31 (3) : 827 – 834.
- [23] Joshi R C, San Martín R, Saez-Navarrete C, *et al.* Efficacy of quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins against golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) in the Philippines under laboratory conditions [J]. Crop Protection, 2008, 27 (3 – 5) : 553 – 557.
- [24] Pipe R, Farley S R, Coles J A. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis* [J]. Cell and Tissue Research, 1997, 289 (3) : 537 – 545.
- [25] Cheng T C. Bivalves [M] // Ratcliffe N A, Rowley A F, ed. Invertebrate blood cells. London: Academic Press, 1981.
- [26] Liu Z H. Immunological characteristics and regulation of marine bivalves [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004. [刘志鸿. 海洋双壳类免疫特性及调节. 青岛: 中国海洋大学, 2004.]
- [27] Ning Z X, Guao J H, Qin Yan, *et al.* Antibacterial properties of litchi seed essential oil on han sausage [J]. Food and Fermentation Industries, 1997, 23 (4) : 34 – 36. [宁正祥, 高建华, 秦燕, 等. 荔枝精油对西式火腿肠的保鲜效果. 食品与发酵工业, 1997, 23 (4) : 34 – 36.]
- [28] Zhang M F, Huang B, Zhang F, *et al.* The antimicrobial experiments on five marine animals' grease [J]. Journal of Fujian Teachers University: Natural Science, 2001, 17 (2) : 115 – 117. [张明凤, 黄彬, 张锋, 等. 5 种海洋动物脂类提取物的抑菌试验. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2001, 17 (2) : 115 – 117.]
- [29] Gorbushin A M, Iakovleva N V. Haemogram of *Littorina littorea* [J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 2006, 86 (5) : 1175 – 1181.
- [30] Zhang Y Y. The pilot study of the haemocytes of *Meretrix meretrix* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2005. [张艳艳. 文蛤 (*Meretrix meretrix*) 血细胞初步研究. 青岛: 中国海洋大学, 2005.]
- [31] Ray M, Bhunia A S, Bhunia N S, *et al.* Density shift, morphological damage, lysosomal fragility and apoptosis of hemocytes of Indian molluscs exposed to pyrethroid pesticides [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35 (2) : 499 – 512.
- [32] Moore M N, Allen J I, Mcveigh A. Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status [J]. Marine Environmental Research, 2006, 61 (3) : 278 – 304.
- [33] Noventa S. Effects of organic and metallorganic pollutants on European gastropod species [D]. Università Ca' Foscari Venezia, 2010: 79 – 80.
- [34] Russo J, Lefeuvre-Orfila L, Lagadic L. Hemocyte-specific responses to the peroxidizing herbicide fomesafen in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) [J]. Environmental Pollution, 2007, 146 (2) : 420 – 427.
- [35] Winston G W, Moore M N, Staatsburg I, *et al.* Decreased stability of digestive gland lysosomes from the common mussel *edulis* by *in vitro* generation of oxygen free radicals [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1991, 21 (3) : 401 – 408.
- [36] Granath W O, Yoshino T P. Characterization of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzymes markers [J]. Journal of Experimental Zoology, 1983, 226 (2) : 205 – 210.
- [37] Matricon-Gondran M, Letocart M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata* I. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1999, 74 (3) : 224 – 234.

A comparison study on immune function characterization of two shell colours of golden apple snail(*Pomacea canaliculata*)

ZHAO Liulan¹, PU Su¹, YANG Song^{1*}, YANG Li¹, LIU Qiao¹,
ZHAO Jinqun¹, YAN Taiming¹, ZHANG Jiaen²

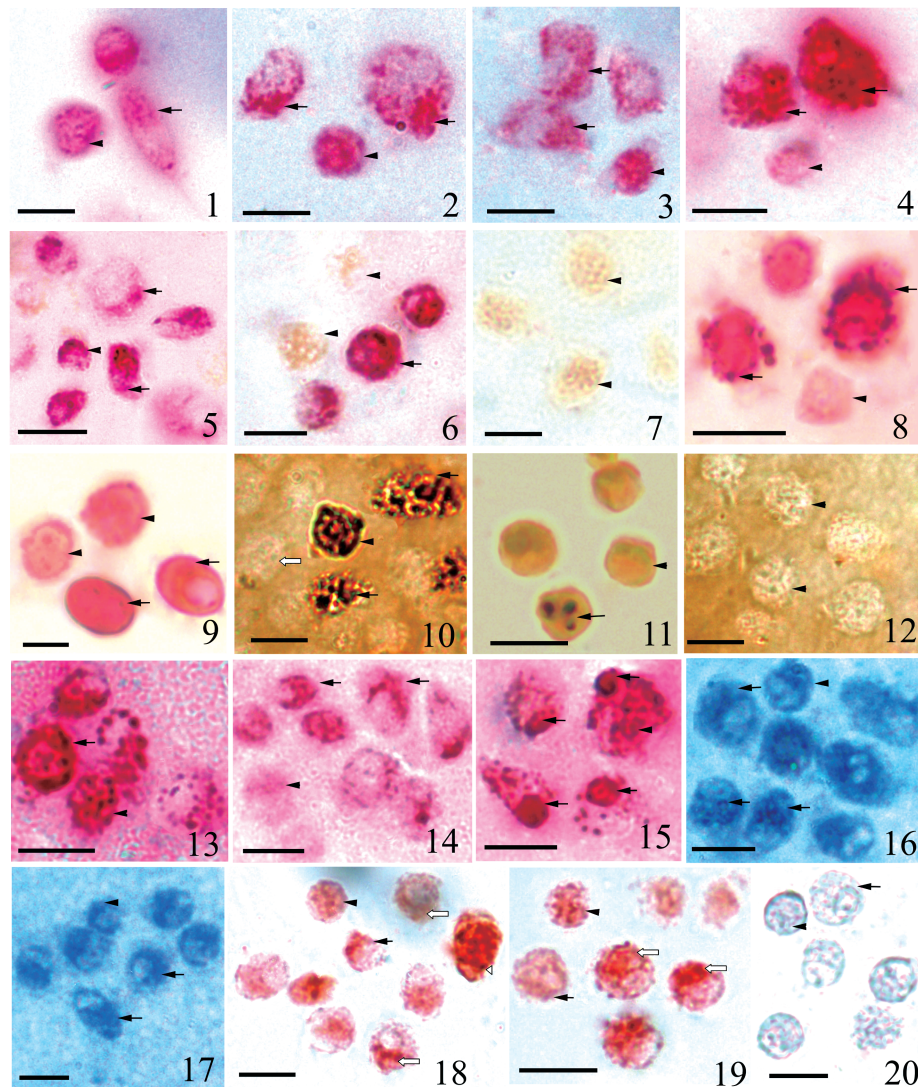
(1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Institute of Tropical and Subtropical Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: With the aim of exploring immunological difference between black and yellow shell-coloured *Pomacea canaliculata*, an acute toxicity test of niclosamide was carried out, and their mortality of niclosamide, the cytochemistry characterization and neutral red retention time (NRRT) of hemocytes were investigated in two kind of snails. The results showed the LC_{50} value of niclosamide for the black-shell snails were 0.77 mg/L and 0.46 mg/L at 24 h and 48 h, and they were higher than the yellow-shell ones. Cytochemical stains (alkaline phosphatase, acid phosphatase, peroxidase, sudan black B, periodic acid schiff, neutral red) showed that most of positive hemocytes were located in the cytoplasm, and the granulocytes were strongly stained. The percentage of positive hemocytes to ACP, AKP, POX of black snails was higher than that in the yellow ones, especially the value of AKP and POX ($P < 0.01$). The intensity of PAS staining in the black snails was stronger than the yellow ones. However, there was no significant difference between NRD and SBB staining. NRRT indicated that the time of neutral red retention in hemocytes of black snails was 9.15 min, which was 1.8 times longer than the yellow ones. This implied that hemocytes of the black snails have higher lysosomal stability. Therefore, the susceptibility of niclosamide, AKP, POX, glycogen and lysosomal stability could affect the immunological function of *P. canaliculata*.

Key words: *Pomacea canaliculata*; hemocytes; immune function; shell colour; cytochemistry characterization; neutral red retention time

Corresponding author: YANG Song. E-mail: ysys210@hotmail.com



图版 黑壳福寿螺和黄壳福寿螺血细胞细胞化学染色

黑壳福寿螺 1~4、8、10、12~13、15~16、18、20; 黄壳福寿螺 5~7、9、11、14、17、19;

其中 1~6. 碱性磷酸酶染色阳性, 7. 碱性磷酸酶阴性对照; 8、9. 酸性磷酸酶阳性, 10、11. 过氧化物酶阳性, 12. 过氧化物酶阴性对照; 13~15. PAS 阳性; 16、17. 苏丹黑阳性, 18、19. 中性红, 20. PAS 阴性对照; 比例尺为 5 μm

1. ◀示透明细胞, ←示颗粒细胞; 2. ←示颗粒细胞中部颗粒呈现强烈阳性, ▶示整个细胞均呈阳性的“类核影细胞”; 3. ←示颗粒细胞颗粒呈现均匀分布, ▶示细胞核着色的细胞; 4. ←示整个细胞质的颗粒呈现强烈阳性的颗粒细胞, ▶示着色较淡的透明细胞; 5. ←示颗粒细胞, ▶示透明细胞; 6. ←示阳性细胞, ▶示阴性细胞; 7. ▶示阴性细胞; 8~11、13、14、16、17. ▶示透明细胞, ←示颗粒细胞; 10. ◀示阴性细胞; 12. ▶示阴性对照血细胞; 15. ←示细胞核强烈阳性细胞, ▶示细胞质颗粒物质强烈阳性; 18、19. ←示染色较淡的透明细胞, ▶示类核影细胞, ◀示强烈着染的颗粒细胞, <示整个细胞强烈着染的颗粒细胞; 20. ←示阴性对照颗粒细胞, ▶示阴性对照透明细胞

Hate Cytochemistry characterization of hemocytes in the black- and yellow-shell snails

The black-shell snails 1~4, 8, 10, 12~13, 15~16, 18, 20; The yellow-shell snails 5~7, 9, 11, 14, 17, 19

AKP positive staining 1~6 with control 7; ACP positive staining 8~9 and POX positive staining 10~11 with control 12; PAS positive staining 13~15, SBB positive staining 16, 17 and NRD positive staining 18, 19 with control 20; Bar length: 5 μm

1. ▶note hyalinocytes, ←note granulocytes; 2. ←note the intensely stained particulate matter of granulocytes, ▶note the intensely stained nuclear shadow-like of hemocytes; 3. ←note the uniform distribution particulate matter of granulocytes, ▶note the intensely stained nucleus; 4. ←note the whole cytoplasmic intensely stained particulate matter of granulocytes, ▶note the less intense hyalinocytes; 5. ←note granulocytes, ▶note hyalinocytes; 6. ←note positive hemocytes, ▶note negative hemocytes; 7. note negative hemocytes; 8~11, 13, 14, 16, 17. ▶note hyalinocytes, ←note granulocytes; 10. ◀note negative hemocytes; 12. ▶note negative hemocytes; 15. ←note the intensely stained nucleus and ▶note the intensely stained particulate matter; 18, 19. ←note the less intense hyalinocytes, ▶note the nuclear shadow-like of hemocytes; ◀note the intensely stained granulocytes; <note the intensely stained granulocytes including the nuclei and cytoplasm; 20. ←note negative granulocyte, ▶note negative hyalinocytes, in the control